

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15364

研究課題名(和文) ナノ粒子への異物認識を巧みに利用/制御した新規アルツハイマー病治療システムの開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic system for Alzheimer's disease using foreign body response to nanoparticles

研究代表者

太田 誠一(Ohta, Seiichi)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授

研究者番号：40723284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ粒子を薬物送達に使用する際には粒子が免疫系に"ゴミ"として認識され貪食されてしまうことが課題であった。本研究ではこれを逆手にとり、アルツハイマー病の原因とされるA β に金ナノ粒子を特異的に結合させ、A β と共にミクログリア細胞に効率的に除去させる新たなアルツハイマー病治療法の開発を目指した。金ナノ粒子の表面にA β 結合性色素であるコンゴレッド(CR)を修飾し、A β 標的ナノ粒子を合成した。合成した粒子がA β に選択的に結合してA β 凝集体を解砕すること、及び免疫細胞による貪食を促進することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病の治療薬として抗A β 抗体が期待されている一方、その治療効果はまだ十分とは言えず、さらに抗体の価格が高いことも課題点として挙げられる。本研究で開発されたA β 標的ナノ粒子は、抗A β 抗体に代わる、新たな概念のアルツハイマー病の治療薬として期待される。さらに、本研究で用いたCR及びAuNPはともに臨床での使用実績があり安価であるため、臨床へのスムーズな実装が期待される。

研究成果の概要(英文)：Use of nanoparticles for drug delivery has been straggling with the foreign body response from immune system. By turning this challenge into advantage, we aimed to develop a novel therapeutic system for Alzheimer's disease via targeting nanoparticles to A β , considered as an origin of Alzheimer's disease, to enhance its elimination by immune system. Congo-red (CR), clinically available A β -binding dye, was modified to the surface of gold nanoparticles to render the A β targeting ability. The obtained particles successfully bound to A β aggregates, dissociated them, and enhanced their uptake by immune cells via phagocytosis.

研究分野：医用化学工学

キーワード：アミロイド 医用ナノ粒子 バイオマーカー ターゲティング アルツハイマー病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は記憶や思考能力を阻害する進行性の脳疾患で、高齢者における認知症の代表例である。アルツハイマー病を発症する原因の一つとして、脳の神経細胞外におけるアミロイドβ (Aβ) の蓄積・凝集が神経細胞死を引き起こすというアミロイド仮説が提唱されている[1]。このため、Aβを標的とした治療法が期待されており、中でも抗Aβ抗体を用いた治療法は盛んに検討されている。抗体の作用機構として、Aβ凝集体に抗体が結合して凝集体を細分化させるという説、Aβに結合した抗体がミクログリア細胞によるAβ貪食を促進するという説、血中のAβを抗体が除去し脳内Aβとの濃度平衡を変化させることで脳内Aβを減少させるという説が提唱されている[2]。抗Aβ抗体を使用した臨床試験では脳内Aβ凝集体が減少し、認知機能が改善したという報告がされているが[3]、未だに治療効果は不十分であり、さらに抗体の価格が非常に高いことも課題点である。そこで、抗体に代わるAβの標的方法としてAβ結合性色素を用いた手法が挙げられる。コンゴレッド (CR) やチオフラビン T (ThT) は抗体より安価でAβに特異的に結合するため、Aβの検出及びアルツハイマー病の診断に利用されているが[4][5]、ミクログリア細胞による貪食を誘導することはできない。一方、ナノ粒子は薬物送達キャリアとして開発されている中で免疫系から異物と認識されてしまうことが課題となっているが、これを逆に利用することで貪食の促進が期待できる。このことから、Aβ結合性色素とナノ粒子を用いた薬物送達を組み合わせることで、新たなアルツハイマー病治療法が開発できると期待される。

2. 研究の目的

本研究ではAβ結合性色素を金ナノ粒子表面に修飾し、Aβ標的化金ナノ粒子を開発する。これにより、Aβ凝集体の細分化及びミクログリア細胞の貪食によってAβ凝集体の脳内からのクリアランスを促進する新規アルツハイマー病治療の創製を目指す (Fig. 1)。得られた粒子の脳への送達には、申請者らが開発を進めている収束超音波による血液脳関門(BBB)開通の技術を利用する。脳への超音波照射により脳への異物の侵入を妨げているBBBを一時的に開通させ、粒子の効率的な送達を行う。上記2つの手法により粒子の治療効果を最大限引き出し、安価でかつ高効率なアルツハイマー病治療法の創製を目指す。

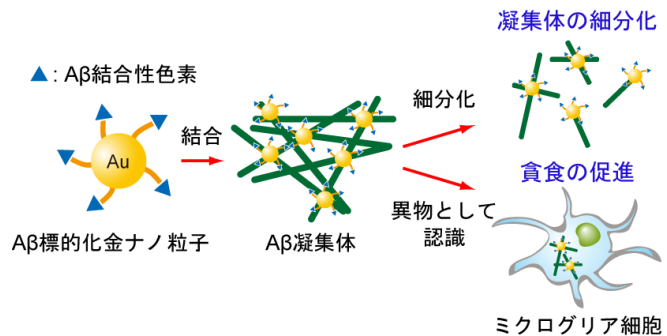


Figure 1. 本研究の概念図

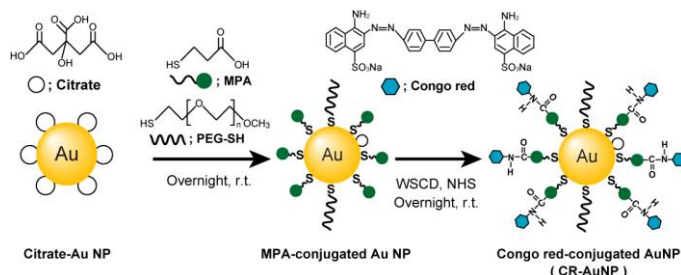
3. 研究の方法

3-1. 収束超音波による脳へのナノ粒子送達における最適サイズの検討

これまで開発を行ってきたマウスへの経頭蓋的な集束超音波照射によるBBB開通を用いた脳へのナノ粒子送達の効率に対する、サイズの影響を検討した。市販のマイクロバブルであるソナゾイド®を 3×10^8 bubblesと、3、15、120 nmの金ナノ粒子400 μgをマウスに尾静注投与し、頭部に1 MHzの超音波をバースト長10 ms、繰り返し周期1 sで40秒間照射した。超音波照射から4時間後にマウスを安楽死させ、生理食塩水で灌流を行った後、脳を回収し、脳への粒子透過量をICP-MSで測定した。

3-2. CR修飾金ナノ粒子 (CR-AuNP) の合成

金ナノ粒子溶液に対し3-メルカプトプロピオン酸 (MPA) を10 /nm²、末端チオール化ポリエチレングリコール (PEG-SH) (Mw. 2000) をMPAに対して0.1当量加えて一晩常温で攪拌した。混合した溶液にMESバッファーに溶解したNHSとWSCDをMPAに対して0.5当量、CRを1当量加え、一晩常温で攪拌した後、遠心分離によって洗浄した (Scheme. 1)。得られた溶液のIRスペクトルを測定し、CRの修飾を評価した。また、遠心分離の際の上澄み液の吸収スペクトルからCRの修飾率を算出した。MPAとPEG-SHの当量比を変化させて合成を行い、粒子の分散安定性を低pH下で評価した。



Scheme 1. 金ナノ粒子表面へのCRの修飾スキーム

3-3. Aβ凝集体細分化の評価

Aβモデルタンパク質であるリゾチーム及びAβの凝集体を用いて、CR-AuNPの凝集体細分化効果をThTアッセイで評価した。リゾチーム凝集体に対してCR-AuNPまたはCRを0.01当量加

えた溶液から各タイムポイントで 60 μL を採取し、これにタンパク質の凝集に応じて蛍光を示す ThT 溶液 10 μM を 3 mL 加え、440 nm の励起波長で蛍光測定を行った。同様に、 $\text{A}\beta$ 凝集体溶液に CR-AuNP または PEG-AuNP を 0.01 当量加え、蛍光強度の時間変化を測定した。凝集体細分化後の溶液について TEM 観察を行った。

3-4. 免疫細胞による食食促進の評価

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 に対し蛍光修飾した $\text{A}\beta$ 凝集体を 0.02 mg/ml で暴露し、24 h インキュベートした。CR-AuNP の添加による食食量への影響を、フローサイトメトリーを用いた RAW264.7 中の $\text{A}\beta$ 凝集体由来の蛍光強度測定により評価した。

4. 研究成果

4-1. 収束超音波による脳へのナノ粒子送達における最適サイズの検討

マウス頭部への超音波照射によって、3 種類全てのサイズの粒子の脳への透過量が有意に向上した (Fig. 2) [6]。また、粒子サイズには最適値が存在し、15 nm の粒子透過量が最も大きくなった。この理由として、BBB の間隙透過性と血中滞留性とのトレードオフが考えられる。小さい粒子ほど超音波照射で生じた BBB の間隙の透過性が高いことが我々の *in vitro* の検討により明らかとなっている一方で、シングル nm の小さい粒子は血中半減期が著しく短いことが報告されている。両者の兼ね合いにより、脳への送達効率を最大にする粒子サイズが決まるものと考えられる。この仮説に基づき、粒子の膜細孔透過と血中の粒子排泄を考慮してモデル化を行った結果、傾向が実験結果と概ね一致した。構築したモデルにより、脳への送達効率を最大化するために最適な粒子径は 6 nm であることが示唆され、以下ではこのサイズの粒子の開発を行った。

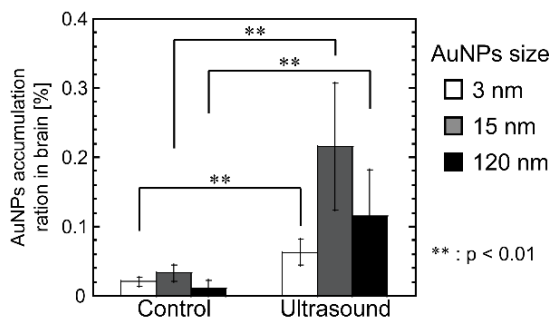


Figure 2 収束超音波による脳へのナノ粒子送達における粒子サイズの影響

4-2. CR 修飾金ナノ粒子 (CR-AuNP) の合成

CR 修飾金ナノ粒子溶液の IR スペクトルを Fig. 3 に示す。1200 cm^{-1} 、1510 cm^{-1} 付近にそれぞれ CR の SO_3 、 $\text{N}=\text{N}$ に由来するピークが確認されたことから、金ナノ粒子への CR の修飾が示唆された。吸収スペクトルから修飾率を算出した結果、0.37 CR/nm²AuNP であった。さらに、CR の PEG に対する当量を変えて粒子を合成し分散安定性を評価した結果、5 当量以上加えた粒子が CR の疎水性により低 pH で凝集したため、以降の実験では CR:PEG を 2:1 の当量比で加えて合成した CR-AuNP を使用した。

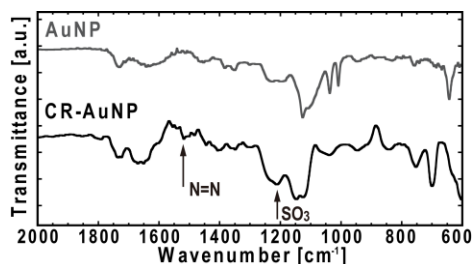


Figure 3. CR-AuNP の IR スペクトル

4-3. $\text{A}\beta$ 凝集体細分化の評価

$\text{A}\beta$ 凝集体細分化過程における ThT の蛍光強度の時間変化を Fig. 4 に示す。CR-AuNP を添加した $\text{A}\beta$ 溶液で、蛍光強度が PEG のみを修飾した AuNP 添加溶液と比較して有意に低下した。 $\text{A}\beta$ モデルタンパク質であるリゾチーム凝集体を用いた場合も、同様に CR-AuNP 添加溶液で有意に蛍光強度が低下した。また、等モルの CR では蛍光強度の低下は認められなかった。以上の結果から、 $\text{A}\beta$ への結合とナノ粒子の立体障害により、凝集体が細分化されたことが示唆された。

$\text{A}\beta$ 凝集体細分化後の溶液を観察した TEM 像を Fig. 5 に示す。 $\text{A}\beta$ 凝集体に CR-AuNP を添加した溶液で $\text{A}\beta$ 凝集体の細分化された断片が観察され、 $\text{A}\beta$ 凝集体上への金ナノ粒子の集積が確認された。一方、PEG のみを修飾した AuNP 添加溶液では大部分の金ナノ粒子は $\text{A}\beta$ 上に集積せず存在し、凝集体は細分化前から変化が見られなかった。以上より、CR-AuNP が $\text{A}\beta$ 凝集体に選択的に結合したことで凝集体が細分化されたことが示唆された。

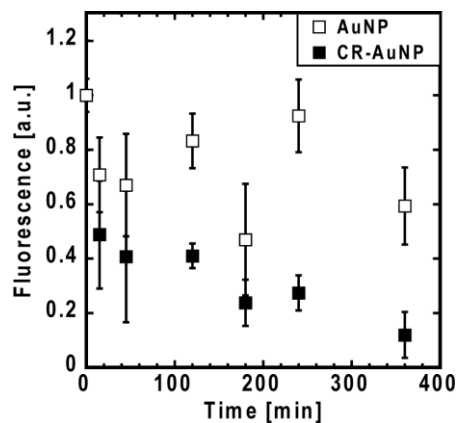


Figure 4. ThT 蛍光強度の時間変化

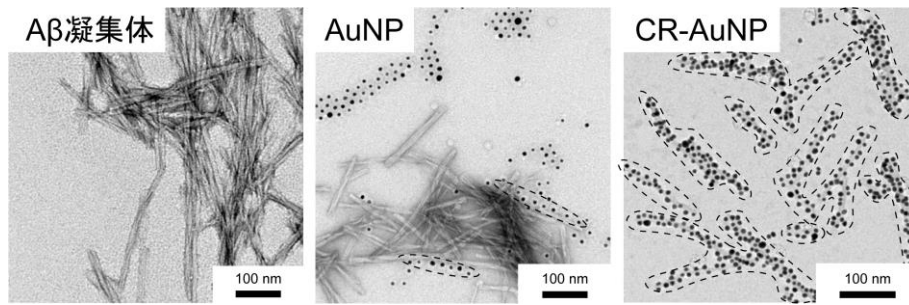


Figure 5. TEM で観察した A β 凝集体構造に対する CR-AuNP 添加の影響
破線は A β に結合した粒子を示す

3-4. 免疫細胞による食食促進の評価

RAW264.7 に対し A β 凝集体と CR-AuNP を暴露した結果、A β 凝集体のみの場合と比較して 30%程度の食食量の増加が認められた。これは、CR-AuNP の結合によって A β 凝集体の異物認識部位が向上したこと、及び前述の凝集体の細分化効果によって食食が促進されたことが原因と考えられる。今後、粒子表面に食食を積極的に促進するリガンドを修飾することで、さらなる食食能の促進が期待される。

本研究では、A β 結合性色素である CR を金ナノ粒子に修飾することで、A β 標的化金ナノ粒子を合成した。CR-AuNP が A β 凝集体に選択的に結合し、凝集体を細分化することを示し、アルツハイマー病の治療への有用性が示唆された。本研究で用いた CR 及び AuNP はともに臨床での使用実績があり安価であるため、抗 A β 抗体に代わる新たなアルツハイマー病治療法として発展していくことが期待される。

参考文献

- [1] D. A. Ghareeb et al., *J. Biomed. Sci. Eng.*, **6**, (2013), 754 [2] Yan-Jiang Wang et al., *Drug Discov. Today*, **11**, (2006), 931 [3] Jeff Sevigny et al., *Nature*, **537**, (2016), 50 [4] Petra Frid, et al., *Brain Res. Rev.*, **53**, (2007), 135 [5] M. Biancalana, S. Koide, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, (2010), 1405 [6] S. Ohta et al: *Sci. Rep.* 10 (2020) 18220.

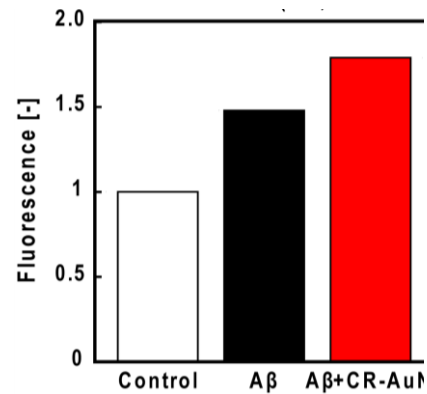


Figure 6. フローサイトメトリーによる蛍光強度測定を用いた、CR-AuNP 添加の有無による RAW264.7 の A β 凝集体食食量の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohta Seiichi, Kikuchi Emi, Ishijima Ayumu, Azuma Takashi, Sakuma Ichiro, Ito Taichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Investigating the optimum size of nanoparticles for their delivery into the brain assisted by focused ultrasound-induced blood?brain barrier opening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75253-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Glancy Dylan, Zhang Yuwei, Wu Jamie L.Y., Ouyang Ben, Ohta Seiichi, Chan Warren C.W.	4. 巻 304
2. 論文標題 Characterizing the protein corona of sub-10 nm nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 102 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2019.04.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 太田誠一
2. 発表標題 生体をシステムとして捉えた医療診断用ナノ粒子の開発
3. 学会等名 化学工学会 第51回秋季大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田誠一
2. 発表標題 生体をシステムとして捉えた診断・治療用ナノ粒子の開発
3. 学会等名 日本学術振興会 プロセスシステム工学第143委員会 令和2年度第1回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田誠一
2. 発表標題 光機能性ナノ粒子を基盤とした次世代診断システムの開拓
3. 学会等名 次世代医療技術研究会 第3回 情報交換会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田誠一・小野村知之・伊藤大知
2. 発表標題 アルツハイマー病治療を目指したアミロイド 標的ナノ粒子の開発
3. 学会等名 化学工学会 第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Seiichi Ohta, Emi Kikuchi, Ayumu Ishijima, Etsuko Kobayashi, Takashi Azuma, Ichiro Sakuma, Taichi Ito
2. 発表標題 Size-dependent delivery of nanoparticles to brain assisted by focused ultrasound-induced BBB opening
3. 学会等名 Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------